

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
12 septembre 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/074565 A2(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/82

Bérard, F-44200 NANTES (FR). GERVOIS, Nadine [FR/FR]; 17, rue Gilbert Bauduz, F-44300 NANTES (FR). DERRE, Laurent [FR/FR]; 2, rue du Clos Torreau, F-44200 NANTES (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR03/00698

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.; CABINET ORES, 36, rue de St-Petersbourg, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 4 mars 2003 (04.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/02703 4 mars 2002 (04.03.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR). UNIVERSITE DE NANTES [FR/FR]; 1, quai de Tourville, F-44000 NANTES (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LINARD, Boris [FR/FR]; 3, rue de Libourne, F-44800 SAINT-HERBLAIN (FR). JOTEREAU, Francine [FR/FR]; 6, place du 116^{ème} Régiment d'Infanterie, F-44300 NANTES (FR). BENLALAM, Housseem [DZ/FR]; 1, rue Rameau, F-44000 NANTES (FR). DIEZ, Elizabeth [FR/FR]; 13, Ramée la Bourchinière, F-44690 SAINT-FIACRE-SUR-MAINE (FR). GUILLOUX, Yannick [FR/FR]; 19, rue du Loquidy, F-44300 NANTES (FR). LABARRIERE, Nathalie [FR/FR]; 10, rue Léon

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: PEPTIDES FOR USE IN ANTITUMOR IMMUNOTHERAPY

(54) Titre : PEPTIDES UTILISABLES EN IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE.

(57) Abstract: The invention concerns the use of immunogenic peptides representing T epitopes presented by the MHC I, derived from Melan-A, Mage-A6, gp 100, tyrosinase and NY-ESO-1 antigens for the diagnosis or treatment of melanomas in HLA-B35 subjects.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de peptides immunogènes représentant des épitopes T présentés par le CMH I, dérivés des antigènes Melan-A, Mage-A6, gp100, tyrosinase et NY-ESO-1 dans le cadre du diagnostic ou du traitement des mélanomes chez des sujets HLA-B35.

PEPTIDES UTILISABLES EN IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE

La présente invention est relative à des peptides représentant des épitopes partagés d'antigènes tumoraux, et à leur utilisation en immunothérapie.

- 5 La vaccination ou immunothérapie peptidique est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'immunisation par des peptides reproduisant des épitopes T d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces
- 10 antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTLs ne reconnaissent pas les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T. Les peptides présentés par le

15 complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

- 20 L'identification de ces épitopes, et notamment de ceux présentés par le CMH I (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité), constitue donc une étape essentielle pour le développement de compositions d'immunothérapie anti-tumorale.

Dans le cas des mélanomes, on a identifié deux classes principales d'antigènes associés aux mélanomes (MAA) : les antigènes spécifiques des mélanomes, peu ou pas exprimés

25 dans les tissus normaux, et les antigènes de différenciation mélanocytaire qui sont également exprimés par les mélanocytes (pour revue, voir CASTELLI *et al.*, 2000, *J Cell Physiol*, 182, 323-31 ; KIRKIN *et al.*, 2002, *Cancer Invest*, 20, 222-36).

Les antigènes de différenciation mélanocytaire, comme Melan-A/MART-1, gp-100 et la tyrosinase, sont exprimés par une proportion importante des tumeurs de type mélanome.

- 30 En outre, ces antigènes sont reconnus efficacement aussi bien par les CTLs de sujets sains que par ceux des patients atteints de mélanome (BENLALAM *et al.*, 2001, *Eur J Immunol*, 31, 2007-15 ; KAWAKAMI *et al.*, 2000, *J Immunother*, 23, 17-27 ; LABARRIERE *et al.*, 1998, *Int J Cancer*, 78, 209-15 ; PITTET *et al.*, 1999, *J Exp Med*, 190, 705-15 ; VALMORI *et al.*, 2002, *Cancer Res*, 62, 1743-50). On connaît à l'heure actuelle, plus de
- 35 trente épitopes de ces antigènes reconnu par les CTLs, dont près des deux tiers sont présentés dans le contexte HLA-A*0201.

Les antigènes spécifiques des mélanomes incluent des familles d'antigènes dits « partagés par les cancers et les testicules » : MAGE, GAGE, BAGE et LAGE. Ces antigènes, qui

sont exprimés par différentes tumeurs, génèrent des épitopes CTL présentés dans une grande variété de contextes HLA, y compris HLA-B et C (KIRKIN *et al.*, 2002). A l'exception de NY-ESO-1 (JAGER *et al.*, 1998, *J Exp Med*, 187, 265-70), et à la différence des antigènes de différenciation mélanocytaire, les antigènes partagés par les cancers et les testicules sont rarement reconnus par les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs). L'identification de la plupart des épitopes présents chez ces antigènes s'est effectuée à l'aide de CTLs générés *ex-vivo* par stimulation répétée de lymphocytes du sang périphérique (PBL) par des cellules présentatrices (CPA) chargées avec des antigènes (SCHULTZ *et al.*, 2001, *Tissue Antigens*, 57, 103-9), à l'exception des épitopes de MAGE-A6 et MAGE-A12, puisqu'ils ont été identifiés avec des clones CTLs dérivés de TILs (PANELLI *et al.*, 2000, *J Immunol*, 164, 4382-92; ZOON & HERCEND, 1999, *Eur J Immunol*, 29, 602-7).

Jusqu'à présent, la plupart des essais d'immunothérapies peptidiques sur les mélanomes ont été effectuées dans le contexte HLA-A*0201 ou HLA-A*0101 et en n'utilisant qu'un nombre limité d'épitopes de TAA (LAU *et al.*, 2001, *J Immunother*, 24, 66-78; MACKENSEN *et al.*, 2000, *Int J Cancer*, 86, 385-92; MARCHAND *et al.*, 1999, *Int J Cancer*, 80, 219-30; PANELLI *et al.*, 2000, *J Immunother*, 23, 487-98; ROSENBERG *et al.*, 1998, *J Natl Cancer Inst*, 90, 1894-900; SALGALLER *et al.*, 1996, *Cancer Res*, 56, 4749-57). Or, la sous-expression d'allèles HLA, et l'apparition de variants de TAA ayant perdu les épitopes reconnus par les CTLs pourraient constituer des mécanismes permettant l'échappement des cellules tumorales, vis à vis du système immunitaire (FERRONE & MARINCOLA, 1995, *Immunol Today*, 16, 487-94; MAEURER *et al.*, 1996, *Clin Cancer Res*, 2, 641-52), ce qui pourrait expliquer la faible efficacité des vaccins utilisant des peptides.

Pour pallier cet inconvénient, il a été proposé d'utiliser des vaccins polyvalents composés d'une multitude de peptides issus de différents TAA et présentés dans des contextes HLA variés. Toutefois, ceci nécessite l'identification de nouveaux complexes peptides/HLA qui soient efficacement présentés par les cellules tumorales.

En outre, l'identification de peptides présentés dans différents contextes HLA permet également de développer des outils permettant de mesurer la réponse des cellules T chez les patients immunisés. En effet, si l'identification de nouveaux peptides antigéniques est essentielle pour augmenter la disponibilité et l'efficacité des vaccins, elle l'est aussi pour améliorer le suivi de la réponse CTL des patients qui ont été immunisés avec des peptides ou d'autres formes d'antigènes, comme des protéines recombinantes complètes ou des virus recombinants.

Dans la mesure où HLA-B35 constitue l'un des allèles HLA-B les plus fréquents, présent chez environ 20% de la population caucasienne (dont 60% correspond à l'allèle B*3501; MORI *et al.*, 1997, *Transplantation*, 64, 1017-27), l'identification de nouveaux peptides

antigéniques présentés dans le contexte HLA-B35 est très souhaitable pour le développement de l'immunothérapie cancéreuse.

Les Inventeurs ont identifié de nouveaux épitopes, qui sont dérivés d'antigènes mélanocytaires ou d'antigènes partagés par les cancers et les testicules, et qui sont

5 présentés dans le contexte HLA-B35.

Les peptides reproduisant ces épitopes peuvent être utilisés dans un but diagnostique ou thérapeutique, dans le cadre de la prévention ou du traitement de mélanomes chez des patients exprimant un allèle HLA-B35, en particulier HLA-B*3501 ou HLA-B*3503.

10 La présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un peptide immunogène représentant un épitope T présenté par le CMH I, choisi parmi :

a) un peptide comprenant la séquence EX₁AGIGILX₂ (SEQ ID NO : 1) dans laquelle X₁ représente A ou P, et X₂ représente T ou Y, capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène Melan-A ;

15 b) un peptide comprenant la séquence EVDPIGHVY (SEQ ID NO : 2), capable d'induire une réponse T cytotoxique dirigée contre l'antigène MAGE-A6 ;

c) un peptide comprenant la séquence VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3), capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène gp100 ;

d) un peptide comprenant la séquence TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4) capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène tyrosinase ;

20 e) un peptide comprenant la séquence MPFATPMEA (SEQ ID NO : 5), capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène NY-ESO-1;

pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient HLA-B35. Avantageusement, ledit médicament est destiné au traitement des mélanomes.

25 Avantageusement, on pourra utiliser :

- au moins un peptide a) répondant à une séquence choisie parmi : TAEEAAGIGILTV (SEQ ID NO : 6), EAAGIGILTVIL (SEQ ID NO : 7), EAAGIGILTV (SEQ ID NO : 8), EAAGIGILTY (SEQ ID NO : 9), EAAGIGILY (SEQ ID NO : 10), EPAGIGILTY (SEQ ID NO : 11), EPAGIGILTV (SEQ ID NO : 12) ;

30 - un peptide b) répondant à la séquence EVDPIGHVY (SEQ ID NO : 2) ;

- au moins un peptide c) répondant à une séquence choisie parmi VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3) et VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) ;

- au moins un peptide d) répondant à une séquence choisie parmi TPRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 14) et TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4) ;

35 - au moins un peptide e) répondant à une séquence choisie parmi : LAMPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 15), LAMPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 16), MPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 17), MPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 18), et MPFATPMEA (SEQ ID NO : 5).

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, on utilise une combinaison comprenant au moins deux peptides de deux catégories différentes parmi les catégories a), b), c), d) ou e) définies ci-dessus, afin d'être en mesure d'induire une réponse cytotoxique contre au moins deux antigènes tumoraux.

- 5 La présente invention a également pour objet une composition multi-épitopique associant au moins deux peptides de deux catégories différentes parmi les catégories a) b) c) d) ou e) ci-dessus. Avantageusement, ces compositions comprennent au moins un peptide de chacune de ces catégories a) b) c) d) ou e).

- Des compositions multi-épitopiques conformes à l'invention peuvent également
10 comprendre un ou plusieurs autre(s) peptides immunogène(s), issus des antigènes mentionnés ci-dessus, ou d'antigènes différents. Ces peptides peuvent représenter des épitopes issus du même antigène, ou de deux ou plusieurs antigènes différents. A titre d'exemple, on citera le peptide EVDPIGHLY (SEQ ID NO : 19), qui représente un épitope de MAGE-A3, déjà connu comme pouvant être présenté dans un contexte HLA-B35
15 (Demande PCT WO 01/53833).

Ces compositions peuvent également comprendre, pour être plus largement utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, un ou plusieurs peptides présentés par des molécules du CMH I autres que HLA-B35. A titre d'exemple, on citera le peptide PLDCVLYRY (SEQ ID NO : 20), décrit ci-après.

- 20 Des compositions multi-épitopiques conformes à l'invention peuvent notamment se présenter sous forme d'un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies de chacun des épitopes choisis.

- Des polypeptides chimériques conformes à l'invention peuvent être facilement obtenus par des méthodes connues en elles-mêmes, et notamment par les techniques classiques de
25 l'ADN recombinant.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention, ainsi qu'un vecteur d'acide nucléique contenant ledit polynucléotide.

- La présente invention englobe également l'utilisation dudit polynucléotide ou dudit vecteur
30 d'acide nucléique en immunothérapie antitumorale.

Des exemples non limitatifs de mise en œuvre de la présente invention sont indiqués ci-après.

- On peut par exemple injecter au patient à traiter un peptide, un polypeptide chimérique, ou une composition multi-épitopique tels que définis ci-dessus, éventuellement associés à un
35 adjuvant approprié.

On peut également utiliser l'un des peptides définis ci-dessus pour charger *in vitro* des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles HLA-B35, notamment des cellules dendritiques, afin d'induire la prolifération de CTLs anti-tumeurs, comme décrit par

exemple par BAKKER *et al.* (Cancer Res., 55, 5330-5334, 1995) ou VAN ELSAS *et al.* (Eur. J. Immunol., 26, 1683-1689, 1996).

Les cellules présentatrices de l'antigène HLA-B35 chargées de la sorte font également partie de l'objet de la présente invention.

- 5 Les polynucléotides conformes à l'invention de préférence intégrés dans des vecteurs d'acide nucléique, notamment des vecteurs viraux tels que des adénovirus, peuvent également être administrés par injection au patient à traiter.

Un polynucléotide comprenant une séquence codant pour un peptide défini par l'une des séquences SEQ ID NO: 1 à 18 ci-dessus, et notamment un polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention, peut également être utilisé pour transfecter *in vitro* des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles HLA-B35, notamment des cellules dendritiques, qui sont ensuite injectées au patient, comme décrit par exemple par KAPLAN *et al.* (J. Immunol., 163(2), 699-707, 1999) ou KIM *et al.* (Annals of Surgical Oncology, 5(1), 64-76, 1998). Ces cellules présentatrices de l'antigène transfectées font également partie de l'objet de la présente invention.

15 La présente invention englobe aussi l'utilisation des peptides définis ci-dessus, pour la détection *in vitro* de CTLs dirigés contre un ou plusieurs des antigènes Melan-A, MAGE-A6, gp100, tyrosinase, et NY-ESO-1, dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet HLA-B35.

- 20 Ces peptides peuvent également être utilisés pour réaliser le tri spécifique de ces CTLs. Les CTLs ainsi isolés peuvent ensuite être amplifiés *in vitro* et réinjectés en grand nombre (de l'ordre du milliard) au patient.

La présente invention a également pour objet des compositions thérapeutiques comprenant, en tant que principe actif, un peptide *ras* muté, une composition multi-épitopique, un polypeptide chimérique, un polynucléotide, ou une cellule présentatrice de l'antigène conforme à l'invention.

25 Les compositions thérapeutiques conformes à l'invention peuvent comprendre en outre les excipients usuels, ainsi que des adjuvants habituellement utilisés en immunothérapie, et permettant par exemple de favoriser l'administration du principe actif, de le stabiliser, d'augmenter son immunogénicité, etc.

30 Parmi les peptides des catégories a), b), c), d), et e) mentionnées ci-dessus, certains étaient déjà connus comme capable d'induire une réponse CTL, mais dans d'autres contextes que HLA-B35.

D'autres n'avaient jamais été décrits comme des épitopes capables d'induire une réponse T cytotoxique et n'avaient donc pas été isolés. Il s'agit des peptides suivants:

- 35 - les peptides EAAGIGILTY (SEQ ID NO : 9), EAAGIGILY (SEQ ID NO : 10), EPAGIGILTY (SEQ ID NO : 11), EPAGIGILTV (SEQ ID NO : 12) ;
- les peptides VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3) et VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) ;

- les peptides TPRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 14) et TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4).

La présente invention englobe également ces peptides particuliers, ainsi que toute composition multi-épitopique comprenant au moins un de ces peptides. Ceci inclut notamment des polypeptides chimériques contenant au moins un de ces peptides. Les polynucléotides codant pour ces polypeptides chimériques, et les vecteurs d'acide nucléique contenant ces polynucléotides font aussi partie de l'objet de la présente invention.

Les inventeurs ont en outre constaté que le peptide VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) issu de l'antigène gp100, était aussi reconnu, dans le contexte HLA*A0101, par un clone T CD8 (M199.6.12) issu d'une population de TILs de mélanome. A partir de ce peptide, ils ont identifié un peptide plus court, (PLDCVLYRY, SEQ ID NO : 20), qui n'est pas reconnu dans le contexte HLA-B35, mais est très efficacement reconnu dans le contexte A*0101. Le peptide SEQ ID NO : 20 fait également partie de l'objet de la présente invention, ainsi que les polypeptides chimériques contenant au moins ce peptides. Les polynucléotides codant pour ces polypeptides chimériques, et les vecteurs d'acide nucléique contenant ces polynucléotides font aussi partie de l'objet de la présente invention. Ce peptide, les polypeptides chimériques le contenant, ainsi que les polynucléotides codant pour ces polypeptides chimériques peuvent être employés dans le cadre de la détection ou du traitement de mélanomes chez des sujets HLA-A1, et notamment HLA*A0101, selon les mêmes techniques que celles indiquées ci-dessus pour les peptides reconnus dans le contexte HLA-B35.

D'autre part, des études effectuées sur des modèles animaux ont permis d'identifier d'autres antigènes de rejet tumoral, dont un grand nombre sont des protéines mutées oncogènes (PREHN *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 18, 769, 1998 ; DE PLAEN *et al.*, PNAS, 85, 2274, 1988 ; DUBEY *et al.*, J. Exp. Med., 185, 695, 1997). La présentation par des molécules du CMH des fragments mutés de ces protéines à la surface des cellules tumorales induit la destruction spécifique de celles-ci par les CTLs et le rejet de la tumeur. Chez l'homme, les protéines mutées oncogènes apparaissent également comme des cibles particulièrement intéressantes pour l'immunothérapie anti-tumorale. Toutefois, ceci implique d'identifier les épitopes présentés à la surface des cellules tumorales et capables d'induire une réponse T cytotoxique.

Parmi les oncogènes les plus fréquemment impliqués dans différents types de tumeurs, on citera les oncogènes *ras* (*K-ras*, *H-ras* et *N-ras*) qui résultent de mutations ponctuelles (substitution d'un seul acide aminé) des proto-oncogènes *ras* p21. Ces mutations interviennent essentiellement au codon 12, au codon 13, ou au codon 61 (BOS, Cancer Res., 49, 4682, 1989 ; WEIJZEN *et al.*, Leukemia, 13, 502, 1999). Du fait du nombre limité de substitutions oncogéniques pouvant intervenir, des mutations *ras* présentes dans

de nombreuses tumeurs identiques peuvent ainsi générer des épitopes tumoraux partagés, présentés par une fraction significative de tumeurs humaines (WEIJZEN *et al.*, Leukemia, 13, 502, 1999).

Il a ainsi été proposé d'utiliser en immunothérapie anti-tumorale des peptides synthétiques reproduisant des épitopes *ras* mutés. Ainsi, la demande PCT WO 92/14756 propose l'utilisation de peptides reproduisant des épitopes *ras* mutés au codon 12 ou au codon 61. Toutefois ces épitopes sont présentés par le CMH II (DQ et DR), et induisent donc une réponse CD4+. Or, bien qu'il puisse être avantageux d'induire ce type de réponse, dans la mesure où les lymphocytes auxiliaires CD4+ permettent d'augmenter la réponse cytotoxique (WALTER *et al.*, N. Engl. J. Medicine, 333, 1038, 1995), la réponse CD8+ demeure l'acteur essentiel de la cytotoxicité. En outre, des études récentes effectuées chez la souris suggèrent que l'immunisation avec des peptides présentés par le CMH II pourrait induire une stimulation de la croissance tumorale au lieu de la protection espérée (SIEGEL *et al.*, J. Exp. Med., 191, 1945, 2000).

Plusieurs épitopes *ras* mutés aux positions 12, 13 ou 61 ont sélectionnés sur la base de leur capacité d'ancrage à des molécules du CMH de classe I (VAN ELSAS *et al.*, Int. J. Cancer, 61, 389, 1995; BERGMANN *et al.*, Cell Immunol., 187, 103, 1998; GOUTTEFANGEAS *et al.*, Human Immunol., 55, 117, 1997). Les peptides ainsi sélectionnés peuvent stimuler la croissance de CTLs spécifiques à partir de PBL *in vitro*. Mais ces CTLs reconnaissent faiblement les cellules tumorales mutées, suggérant que l'expression endogène de ces épitopes est limitée (VAN ELSAS *et al.*, Int. J. Cancer, 61, 389, 1995; ABRAMS *et al.*, Cell Immunol., 182, 137, 1997; BERGMANN *et al.*, Cell Immunol., 187, 103, 1998), et qu'ils ne permettent donc pas l'élimination efficace des cellules tumorales par des CTLs spécifiques, ce qui limite considérablement leur intérêt en immunothérapie.

Il apparaît donc nécessaire de disposer d'autres épitopes *ras* mutés restreints au CMH I et présentés efficacement par une fraction significative de tumeurs humaines.

Les Inventeurs ont maintenant identifié un épitope *ras* muté en position 61 par substitution d'une glutamine par une arginine (Q61R), et restreint au CMH I. Cet épitope, dénommé ci-après 55-64^{Q61R} est présenté efficacement par plusieurs lignées de mélanome HLA-A*0101+ exprimant un oncogène *ras* portant la mutation Q61R. Il est capable d'induire spécifiquement l'expansion de clones de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) obtenus à partir de ces mélanomes. De plus, les cellules dendritiques chargées avec ce peptide stimulent de façon efficace des CTLs spécifiques à partir de lymphocytes du sang périphérique (PBL) de donneurs sains HLA-A*0101, et ces CTLs reconnaissent toutes les lignées de mélanomes HLA-A*0101 exprimant l'oncogène *ras* Q61R, et ne reconnaissent pas les cellules exprimant la protéine *ras* non-mutée.

Le peptide 55-64^{Q61R} ne possède pas une capacité d'ancrage supérieure à celle du peptide de type sauvage correspondant. L'affinité de liaison à HLA-A*0101 du peptide de type sauvage est similaire à celle du peptide 55-64^{Q61R}. Cependant, même à concentrations élevées, ce peptide de type sauvage ne peut induire ni l'expansion de TIL spécifiques, ni celle de CTLs spécifiques. Il apparaît donc que la substitution d'une glutamine par une arginine en position 61 crée un nouvel épitope présenté par HLA-A*0101.

En outre, une analyse effectuée sur la banque de données BIMAS (http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/hla_bind ; PARKER et al., J. Immunol. 152, 163, 1994), montre que ce peptide a un score de liaison identique pour HLA-A*0101 et HLA-B*1501.

En conséquence, la présente invention a également pour objet l'utilisation d'un peptide *ras* muté immunogène de séquence ILDTAGREEY (SEQ ID NO : 35) pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement immunothérapeutique de tumeurs chez un patient HLA-A*0101 ou HLA-B*1501, :

Avantageusement, ledit médicament est utilisable pour le traitement de tumeurs exprimant une protéine K-*ras*, H-*ras* ou N-*ras* mutée par substitution de la glutamine en position 61 par une arginine.

On citera notamment les mélanomes, ainsi que d'autres tumeurs dans lesquelles les mutations *ras* affectant le résidu 61 sont détectées avec une fréquence élevée, telles que les naevi mélanocytiques congénitaux (PAPP et al., Journal of Medical Genetics, 36, 610, 1999), les myélomes multiples (BEZIEAU et al., Hum. Mutat., 18, 281, 2001), et les tumeurs de la thyroïde (ESAPA et al., Clinical Endocrinology, 50, 529, 1999).

Ledit peptide est utilisable notamment dans le cadre de compositions multi-épitopiques, et en particulier de polypeptides chimériques, comme mentionné ci-dessus. Un polynucléotide codant pour un tel polypeptide chimérique, ainsi qu'un vecteur d'acide nucléique contenant ledit polynucléotide peuvent également être utilisés comme mentionné ci-dessus.

Ledit peptide ou ledit polynucléotide peuvent aussi être utilisés respectivement pour charger ou transfecter *in vitro* des cellules présentatrices de l'antigène HLA-A*0101 ou HLA-B*1501 professionnelles, afin d'induire la prolifération de CTLs anti-tumeurs.

Les cellules présentatrices de l'antigène, HLA-A*0101 ou HLA-B*1501 chargées ou transfectées de la sorte font également partie de l'objet de la présente invention.

Ledit peptide *ras* muté peut également être utilisé pour détecter *in vitro* des CTLs dirigés contre l'antigène *ras* muté dont il est issu, dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet HLA-A*0101 ou HLA-B*1501. Il peut également être utilisé pour réaliser le tri spécifique de ces CTLs.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant les propriétés de peptides *ras*

mutés conformes à l'invention utilisables en immunothérapie, par la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE D'EPITOPES ANTIGENIQUES PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA-B35 ET RECONNUS PAR DES CLONES CTLS :

Lors d'une étude précédente (BENLALAM *et al.*, 2001), les inventeurs ont obtenu des clones de TILs CD8+ restreints à HLA-B35, et reconnaissant respectivement les antigènes Tyrosinase (TIL M171), Melan-A (TIL M171 and M28), et gp100 (TIL M171, M28 et M110).

Ils ont complété cette collection de clones par un clone reconnaissant MAGE-A3/MAGE-A6 (TIL-M171) et un clone reconnaissant NY-ESO-1 (TIL M118).

La réponse de ces différents clones TIL vis-à-vis de cellules COS-7 co-transfectées avec l'antigène et l'allèle HLA-B35 pertinents est détectée par mesure de leur production de TNF.

Les cellules COS-7, cultivées dans du milieu DMEM (Sigma) contenant 10% de sérum de veau fœtal, des antibiotiques et de la L-glutamine, ont été transfectées par l'ADNc codant pour l'un des allèles HLA-B*3501, HLA-B*3503, HLA-B*3508, seul ou en association avec un ADNc codant pour l'un des antigènes MAGE-A3, MAGE-A6, tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp-100, et NY-ESO1/LAGE-2. La transfection a été effectuée selon le protocole décrit par DE PLAEN *et al.* (Methods, 12, 125-42, 1997). 16,5 10³ cellules COS-7 ont été transfectées avec 100 ng de plasmide pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA), contenant l'ADNc de l'allèle HLA-B*35 concerné, et, pour la co-transfection, 100 ng de plasmide contenant l'ADNc codant pour l'antigène choisi.

Ces cellules COS-7 ont été utilisées 48h après transfection pour stimuler les différents clones TILs (2x10³ à 10⁴). Les surnageants de culture ont été prélevés 6 heures plus tard et leur concentration en TNF a été déterminée par mesure de la cytotoxicité de ces surnageants de culture pour le clone 13 WEHI 164, comme décrit par DE PLAEN *et al.* (1997, précité).

Les résultats sont illustrés par la Figure 1.

En ordonnée, la concentration de TNF en pg/ml

En abscisse les différentes populations de TIL

□: Sécrétion de TNF par les clones TIL en présence des cellules COS-7 transfectées uniquement par un ADNc codant pour une molécule HLA-B35.

■: Sécrétion de TNF par les clones TILs en présence des cellules COS-7 co-transfectées avec un ADNc codant pour une molécule HLA-B35 et un ADNc codant pour un MAA.

Deux clones (M171.95B and M28.10B), reconnaissent un complexe Melan-A/B*3501, un clone (M28.9B) reconnaît un complexe gp100/B*3501, un clone (M171.100B) reconnaît

un complexe tyrosinase/B*3501, un clone (M171.8C) reconnaît un épitope MAGE-A3 et MAGE-A6 dans le contexte B*3501 et un clone (M118.45) reconnaît un épitope NY-ESO-1 dans les contextes B*3501 et B*3503.

5 **EXEMPLE 2 : IDENTIFICATION DES EPITOPES ANTIGENIQUES PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA-B35.**

Pour identifier les régions codant pour les épitopes reconnus par les clones TILs, les inventeurs ont construit une série de fragments des ADNc des différents MAAs.

10 Les fragments d'ADNc Melan-A/MART-1 et NY-ESO-1 ont été obtenus par digestion à l'exonucléase III : les plasmides comprenant l'ADNc codant pour Melan-A/MART-1 ou NY-ESO-1 ont été ouverts par XbaI et ApaI, ou SpHI et NotI respectivement. Les fragments obtenus ont ensuite été digérés par l'exonucléase III à l'aide du système Erasea-base (Promega, Madison, WI).

15 Un fragment de restriction de gp-100 (1156-1986) contenant les nucléotides situés entre le site KpnI 1156 pb en aval du codon d'initiation, et la fin de la séquence codante, a été généré par digestion enzymatique par KpnI.

Les fragments d'ADNc correspondant aux fragments des antigènes tyrosinase et gp100 ont été obtenus par PCR à partir des plasmides contenant la séquence complète codant pour chacun de ces deux antigènes.

20 L'expression de ces différents fragments par les cellules COS-7 s'effectue comme dans l'exemple 1. Les réponses des différents clones TILs vis-à-vis de ces cellules COS-7 co-transfectées avec les fragments d'antigène et l'allèle HLA-B35 pertinents sont mesurées comme dans l'exemple 1.

Les résultats sont illustrés dans la figure 2 :

25 Les positions des régions des ADNc codant pour les épitopes potentiels sont indiquées en paires de bases.

☐: Fragment reconnu par des clones CTLs spécifiques (sécrétion de TNF significative).

☒: Fragment non reconnu par des clones CTLs spécifiques (sécrétion de TNF non-significative).

30 Il apparaît que les différentes populations TILs reconnaissent des épitopes qui sont codés respectivement par le fragment d'ADNc Melan-A s'étendant des nucléotides 95 à 119 (acides aminés 32 à 39), le fragment d'ADNc gp100 1200 à 1601 (acides aminés 400 à 533), le fragment d'ADNc tyrosinase 937 à 975 (acides aminés 313 à 325) et le fragment d'ADNc NY-ESO-1 259 à 339 (acides aminés 87 à 113).

35 **EXEMPLE 3 : IDENTIFICATION DES PEPTIDES ANTIGENIQUES PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA-B35.**

Les peptides de type sauvage et modifié dont les séquences sont indiquées dans le Tableau I ci-dessous ont été obtenus auprès de EPYTOP (Nîmes, France). La pureté (> 70%) est

contrôlée par chromatographie liquide à haut rendement en phase inverse (HPLC). Les peptides sont lyophilisés, puis dissous dans du DMSO à 10 mg/ml et stockés à -80°C.

La réponse des différents clones TIL a été évaluée, par un test de relargage de TNF, après 6 heures de co-culture avec des cellules EBV exprimant une molécule HLA-B*3501 chargée avec 10µM du peptide d'intérêt. Les résultats sont réunis dans le tableau I.

Tableau I

Position des peptides	Séquence	TNF pg/ml
Melan-A		
22-33	TTAEAAAGIGIL (SEQ ID NO : 21)	2
23-35	TAEAAAGIGILTV (SEQ ID NO : 6)	107
26-37	EAAGIGILTVIL (SEQ ID NO : 7)	125
26-35	EAAGIGILTV (SEQ ID NO : 8)	182
27-35	AAGIGILTV (SEQ ID NO : 22)	4
26-34	EAAGIGILT (SEQ ID NO : 23)	13
gp100		
470-479	QVPLDCVLYR (SEQ ID NO : 24)	430
471-479	VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3)	170
471-480	VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13)	380
472-480	PLDCVLYRY (SEQ ID NO : 20)	2,8
Tyrosinase		
309-322	TPRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 14)	308
309-321	TPRLPSSADVEFC (SEQ ID NO : 25)	214
309-320	TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4)	605
309-319	TPRLPSSADVE (SEQ ID NO : 26)	89
310-322	PRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 27)	27
309-318	TPRLPSSADV (SEQ ID NO : 28)	0,2
312-320	LPSSADVEF (SEQ ID NO : 29)	7,4
312-321	LPSSADVEFC (SEQ ID NO : 30)	9,7
MAGE-A3		
168-176	EVDPIGHLY (SEQ ID NO : 19)	265
MAGE-A6		
168-176	EVDPIGHVY (SEQ ID NO : 2)	43
NY-ESO-1		
92-104	LAMPFATPMEAE (SEQ ID NO : 15)	345
92-103	LAMPFATPMEAE (SEQ ID NO : 16)	219
94-104	MPFATPMEAE (SEQ ID NO : 17)	264
94-103	MPFATPMEAE (SEQ ID NO : 18)	292
94-102	MPFATPMEA (SEQ ID NO : 5)	258
92-100	LAMPFATPM (SEQ ID NO : 31)	87
96-104	FATPMEAE (SEQ ID NO : 32)	0

D'autre part, l'antigénicité des peptides a été testée en évaluant la capacité des clones TILs à lyser des cellules BM36.1 (KELLY *et al.*, 1992, *Nature*, 355, 641-4), qui sont déficientes en transporteur TAP, et qui expriment naturellement HLA-B*3501 et HLA-A*0101. Les cellules BM36.1 sont marquées pendant 1h à 37°C avec 100 Ci de ⁵¹Cr (Na²⁵¹CrO₄, ORIS, Gif-sur-Yvette, France). Les cellules sont ensuite pulsées pendant 20 minutes avec les différents peptides synthétiques. 10³ cellules BM36.1 ainsi traitées sont incubées avec 10⁴ cellules T du clone (rapport Effecteur :Cible de 10 :1) pendant 4 heures. Les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de ⁵¹Cr libéré est évalué à l'aide d'un compteur de plaque β (EG&G Wallac, Evry, France). Pour chaque clone TIL, un contrôle négatif est effectué avec un peptide non-pertinent.

La quantité de peptide nécessaire pour obtenir 50% de la lyse maximale (EC50) a été déterminée. D'autre part, l'affinité et la stabilité des peptides pour le HLA-B35 ont été mesurées comme décrit par TOURDOT et al., Eur. J. Immunol., 30 :3411-3421, 2000). Pour mesurer l'affinité des peptides, les cellules BM36.1 sont incubées pendant 18h avec une gamme de concentrations de chaque peptide. Les cellules BM36.1 sont parallèlement incubées avec une gamme d'un peptide de référence, se fixant au HLA-B35 (peptide 37F, TAKAMIYA et al., Int. Immunol., 6 : 255-261, 1994 ; SCHÖNBACH et al., J. Immunol., 154 : 5951-5958, 1995). La quantité relative de peptide fixée est ensuite estimée à chaque concentration, pour chacun des peptides, par la mesure de stabilisation du HLA-B35 à la surface cellulaire. Cette mesure est effectuée en cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti HLA-B/C (qui ne reconnaît dans le cas des cellules BM36.1 que le HLA-B*3501, ces cellules n'exprimant spontanément aucune molécule HLA-C). On calcule ensuite le % de liaison au B*35 pour chaque concentration, en fixant le 100% de liaison pour 100 µM de chaque peptide. L'affinité relative (RA) est ensuite déterminée de la façon suivante :

$$RA = \frac{\text{concentration de peptide pour 20\% de liaison}}{\text{concentration du peptide 37F pour 20\% de liaison}}$$

Pour mesurer la stabilité des peptides, les cellules BM36.1 sont incubées 18h avec 100 µM de chacun des peptides. Elles sont ensuite incubées en présence de BFA (10 µg/ml) pendant une heure afin de bloquer le transport de molécules HLA nouvellement synthétisées à la surface cellulaire. Les cellules BM36.1 sont lavées en PBS et reprises dans du milieu de culture contenant 5% SVF et 0.5 µg/ml de BFA, ce qui constitue le temps 0. Des cellules sont ensuite prélevées, après 30 minutes, 1h, 2h, 4h et 6h d'incubation. La quantité relative de peptide fixée est ensuite estimée à chaque temps, pour chacun des peptides, par la mesure de stabilisation du HLA-B35 à la surface cellulaire. Cette mesure est effectuée en cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti HLA-B/C. Le temps indiqué dans le tableau II correspond au temps de 1/2 vie du peptide sur le HLA-B*35.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3, et le Tableau II ci après.

Tableau II

Position des peptides	Séquence	EC 50	R A	Stabilité
Melan-A				
26-35	EAAGIGILTV (●; SEQ ID NO : 8)	0,5 nM	5,9	1h30
26-35	EAAGIGILTY (■; SEQ ID NO : 9)	0,01 nM	0,75	>6h
26-34	EAAGIGILY (▲; SEQ ID NO : 10)	10 nM	1,32	>6h
26-35	EPAGIGILTY (□; SEQ ID NO : 11)	0,05 nM	0,66	>6h
26-34	EPAGIGILY (*; SEQ ID NO : 33)	100 nM	0,4	>6h
26-35	EPAGIGILTV (O; SEQ ID NO : 12)	0,8 nM	5,1	1h30
gp100				
471-480	VPLDCVLYRY (□; SEQ ID NO : 13)	0,02 nM	2,6	>6h
471-479	VPLDCVLYR (O; SEQ ID NO : 3)	2 nM	20	<30 min
470-479	QVPLDCVLYR (■; SEQ ID NO : 24)	20 µM	-	-
Tyrosinase				
309-322	TPRLPSSADVEFCL (O; SEQ ID NO : 14)	2 nM	>20	>6h
309-321	TPRLPSSADVEFC (●; SEQ ID NO : 25)	12 nM	16,7	<30 min
309-320	TPRLPSSADVEF (□; SEQ ID NO : 4)	0,2 nM	1,3	>6h
312-320	LPSSADVEF (*; SEQ ID NO : 29)	-	1,25	6h
MAGE-A3				
168-176	EVDPIGHLY (O; SEQ ID NO : 19)	0,45 pM	2,3	>6h
MAGE-A6				
168-176	EVDPIGHVY (◇; SEQ ID NO : 2)	4,2 nM	1,1	6h
NY-ESO-1				
92-104	LAMPFATPMEAEL (□; SEQ ID NO : 15)	0,1 nM	0,58	>6h
92-103	LAMPFATPMEAEL (▲; SEQ ID NO : 16)	5 nM	0,75	>6h
94-104	MPFATPMEAEL (●; SEQ ID NO : 17)	0,05 nM	1,32	>6h
94-103	MPFATPMEAEL (O; SEQ ID NO : 18)	1 nM	0,66	>6h
94-102	MPFATPMEA (■; SEQ ID NO : 5)	1 pM	0,4	>6h
92-100	LAMPFATPM (△; SEQ ID NO : 31)	100 nM	5,1	1h30

Légende de la Figure 3 : En ordonnée, le pourcentage de lyse cellulaire obtenue. En abscisse la concentration en peptide (en nM).

Les résultats des Tableaux I et II et de la Figure 3 montrent que:

- 5 * Trois peptides Melan-A chevauchants sont reconnus par le clone M28.10B. Le peptide le plus efficacement reconnu est le décapeptide 26-35 (EAAGIGILTV, SEQ ID NO : 8.). Ce peptide Melan-A 26-35 correspond probablement au peptide naturellement présenté, dans le contexte B*3501, par les cellules de mélanome et reconnu par les TIL du patient M28. Il est connu que ce même peptide Melan-A 26-35 est présenté par des molécules HLA, mais
- 10 uniquement dans le contexte HLA-A*0201 (KAWAKAMI *et al.*, 1994, *J Exp. Med*, 180, 347-52 ; VALMORI *et al.*, 1998, *J Immunol*, 160, 1750-8). Une présentation croisée d'un même épitope par différents isotypes de molécules HLA de classe I est relativement peu commune.
- * Le clone spécifique de gp100 (M28.9B) reconnaît, dans le contexte HLA-B*3501, trois
- 15 peptides chevauchants (deux décimères et un nonamère) localisés entre les acides aminés 470 et 480. Cependant, des concentrations importantes du peptide QVPLDCVLYR (SEQ ID NO : 24) sont nécessaires pour induire une réponse du clone T spécifique (EC50 à 20 µM). Les résultats de mesure d'affinité et de stabilité pour ce peptide montrent qu'il

n'est pas capable de se fixer au HLA B*35. La faible réponse obtenue par le clone peut s'expliquer par une contamination de ce peptide (préparé à 70% de pureté) avec d'autres peptides reconnus par ce clone T.

Plusieurs épitopes dérivés de gp100 présentés dans les contextes HLA-A ou C sont connus
5 (CASTELLI *et al.*, 1999, *J Immunol*, 162, 1739-48 ; KAWAKAMI *et al.*, 1998; TSAI *et al.*, 1997, *J Immunol*, 158, 1796-802). En revanche, on ne connaissait pas jusqu'à présent d'épitopes de gp100 présentés dans le contexte HLA-B.

* Le clone spécifique de la tyrosinase (M171.100B) reconnaît efficacement trois peptides chevauchants : le 14-mer 309-322, le 13-mer 309-321, et le 12-mer 309-320. Le 12-mer est
10 le peptide reconnu le plus efficacement, avec 50% de la lyse maximale obtenue à 0,2 nM, contre 2 nM et 12 nM pour le 14-mer et le 13-mer respectivement (figure 3). La délétion de la phénylalanine à l'extrémité C-terminale du 12-mer réduit fortement la reconnaissance par les CTLs. Le peptide 312-320, dont il a été montré qu'il est reconnu par un clone CTL dans le contexte HLA-B*3501 (MOREL *et al.*, 1999, *Int J Cancer*, 83, 755-9), n'est pas
15 reconnu par le clone TIL M171.100B. En outre, si des exemples d'épitopes de cellules de type 11-mer (AARNOUDSE *et al.*, 1999, *Int. J Cancer*, 82, 442-8; CHIARI *et al.*, 1999, *Cancer Res*, 59, 5785-92; KAWAKAMI *et al.*, 2001, *J Immunol*, 166, 2871-7) et 14-mer existe (PROBST-KEPPER *et al.*, 2001, *J Exp Med*, 193, 1189-98), il s'agit d'épitopes de taille significativement supérieure à celle des épitopes habituellement présentés par les
20 cellules T.

* Le clone M171.8C spécifique de MAGE-A3/A6 reconnaît l'épitope EVDPIGHLTY MAGE-A3/B*3501 précédemment décrit par SCHULTZ *et al.*, (2001, précité). Comme ce clone TIL réagit également avec MAGE-A6, ceci indique que le peptide MAGE-A6 168-176 (EVDPIGHVY), qui diffère de l'épitope MAGE-A3 par un seul acide aminé en
25 position 8, constitue un autre épitope de mélanome restreint au contexte HLA-B*3501.

* Le clone spécifique d'un épitope NY-ESO-1 dans les contextes B*3501/B*3503 (M118.45) reconnaît efficacement cinq peptides chevauchants : le 13-mer 92-104, le 12-mer 92-103, le 11-mer 94-104, le décimère 94-103 et le nonamère 94-102. Le nonamère 94-102 est le peptide reconnu le plus efficacement, avec 50% de la lyse maximale obtenue
30 à 1 pM, contre 0.05 nM pour le 11-mer, 0,1 nM pour le 13-mer, 1 nM pour le décimère et 5 nM pour le 12-mer.

Il est connu que les nonamères 94-102 et 92-100 sont présentés dans les contextes HLA-B51 (JAGER *et al.*, *Cancer Immunity*, 2002, vol2, page 12) et HLA-Cw3 (GNJATIC *et al.*, 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10917-22) respectivement. Cependant, leur
35 présentation dans un contexte HLA-B35 n'avait pas été décrite auparavant.

EXEMPLE 4 : MODIFICATION DES PEPTIDES ANTIGENIQUES PRESENTES DANS LE CONTEXTE HLA-B35.

Certains des peptides antigéniques identifiés ne présentent pas les résidus d'ancrage appropriés pour les molécules HLA-B*3501, i.e. P, A or V en position 2, Y, F, M, L or I en position 9, pour les nonamères, et en position 10 pour les décimères (FALK *et al.*, 1993, *Immunogenetics*, 38, 161-2 [erratum dans *Immunogenetics* 1994;39(5):379]).

Pour essayer d'augmenter l'affinité de ce peptide pour le contexte HLA-B*3501 et la réponse des cellules T, les inventeurs ont introduit des résidus modifiés aux positions 2 et/ou 9, ou 10, des peptides Melan-A/MART1 26-34 et 26-35 respectivement.

Les résultats obtenus avec ces peptides modifiés sont présentés dans la figure 3 (Melan A). On observe que les décapeptides modifiés EAAGIGILTY (SEQ ID NO : 9) et EPAGIGILTY (SEQ ID NO : 11) induisent une lyse maximale par le clone M28.10B à des concentrations 10 à 50 fois inférieures au peptide sauvage (10 et 50pM au lieu de 500pM). En outre ces peptides présentent une stabilité améliorée (figure 3).

Ces modifications permettent donc d'augmenter l'affinité de liaison de ces peptides pour HLA-B*3501, mais aussi d'induire une réactivité supérieure du clone TIL spécifique.

EXEMPLE 5 : PRESENTATION NATURELLE DES PEPTIDES ANTIGENIQUES DANS LE CONTEXTE HLA-B35 PAR LES CELLULES DE MELANOME.

Pour tester l'intérêt, en tant que cibles pour l'immunothérapie, des différents peptides antigéniques identifiés dans les exemples 3 et 4, les inventeurs ont analysés leur présentation par un panel de lignées de cellules de mélanome exprimant les différents antigènes, dont sont dérivés ces peptides, et les molécules HLA-B*3501. Pour augmenter l'expression à la surface des cellules des molécules HLA, les cellules de mélanome ont été préincubées, pour certaines expérimentations, 48 heures dans du milieu contenant 500 U/ml de IFN- γ (Tebu, Paris, France).

La réponse des différents clones TIL vis à vis de ces lignées est détectée par mesure de leur production de TNF comme dans l'exemple 1 (Rapport Effecteur :Cible de 1 :3).

Des contrôles négatifs ont été effectués en utilisant des lignées cellulaires de mélanome n'exprimant pas les molécules HLA (M113).

Les lignées de cellules de mélanome ont été établies à partir de fragments de tumeurs métastatiques ou de tumeurs ayant envahi les ganglions lymphatiques, et mises en culture dans du milieu RPMI 1640 (Sigma, St Loins, USA) contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France), de la pénicilline (10 mg/ml) de la streptomycine (10U/ml) (Sigma) et de la L-glutamine (2nM) (Sigma, St Louis, USA).

Les résultats sont illustrés par la figure 4 : en ordonnée, la concentration en TNF en pg/ml ; en abscisse, les lignées de mélanome exprimant HLA-B35 et les différents antigènes (M47, M125, M131, M140, et M147), ou n'exprimant pas l'allèle HLA-B35 (M113).

■ : lignées cellulaires de mélanome pré-traitées avec 500U/ml d'IFN- γ .

□ : lignées cellulaires de mélanome non pré-traitées avec l'INF- γ .

Les clones spécifiques de Melan-A, de la tyrosinase et de MAGE-A3 reconnaissent les lignées cellulaires de mélanome M47, M131 et M147 indépendamment d'un traitement à l'INF- γ . Toutefois, ces mêmes clones ne reconnaissent les lignées M125 et M140 qu'après

5 l'induction de l'expression de HLA-B35 par un traitement à l' INF- γ .

Le clone spécifique de gp100 reconnaît une lignée de mélanome indépendamment d'un traitement à l'INF- γ (M147). Ce clone reconnaît également les lignées M125 et M140 après un traitement par l'INF- γ (faiblement pour M125).

10 Le clone spécifique de NY-ESO-1 reconnaît l'une de ces lignées exprimant spontanément cet antigène (M47) et les deux autres lignées après traitement à l'INF- γ (M131 et M140, figure 4).

15 Dans le cas des lignées M125 et M140, l'absence de reconnaissance de ces lignées, par les différents clones TIL, est probablement liée à un nombre limité de complexes CMH/peptides présents à la surface de ces cellules. En effet, ces deux lignées cellulaires expriment la molécule HLA-B35 uniquement après traitement à l'INF- γ .

La reconnaissance spontanée des lignées de mélanome par les différents clones T CD8, montre que les épitopes identifiés sont naturellement présentés par ces tumeurs.

EXEMPLE 6 : ANTIGENICITE DU PEPTIDE RAS MUTE 55-64^{Q61R}

20 Les peptides *ras* de type sauvage 55-64^{WT} (ILDTAGQEEY ; SEQ ID NO : 34), le décimère muté 55-64^{Q61R}, et le peptide MAGE-A3 (EVDPIGHLY ; SEQ ID NO : 20) ont été obtenus auprès de SYNT:EM (Nîmes, France). La pureté (>85%) est contrôlée par chromatographie liquide à haut rendement en phase inverse. Les peptides sont lyophilisés, puis dissous dans du DMSO à 10 mg/ml et stockés à -80°C.

25 L'antigénicité du peptide 55-64^{Q61R} et celle de son analogue de type sauvage (55-64^{WT}), sont évaluées en testant la capacité de ces peptides à induire la croissance de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques par stimulation *in vitro* de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par des cellules dendritiques (DC) pulsées avec ces peptides.

30 Les lymphocytes CD8+ sont obtenus à partir des PBMC d'un donneur HLA-A*0101 par tri négatif des cellules T CD4+ sur billes magnétiques (MILTENY BIOTECH, France).

35 Les cellules dendritiques sont préparées à partir de PBMC adhérentes mises en culture pendant 7 jours dans des plaques de culture à 6 puits contenant du milieu de culture RPMI additionné de sérum de veau fœtal 10%, 50 ng/ml de GM-CSF (SIGMA) et 50 ng/ml d'IL-4 (SIGMA). A J+7, la maturation des cellules dendritiques est induite pendant 2 jours dans un milieu de culture RPMI additionné de sérum de veau fœtal 10%, 10 ng/ml de TNF- α (SIGMA) et 100 μ g/ml de Poly-IC (SIGMA). A J+9, les cellules dendritiques matures sont

incubées pendant 2 heures avec 5 µg/ml de peptide *ras* 55-64^{Q61R} ou de peptide *ras* 55-64^{WT} ; elles sont ensuite lavées pour éliminer les peptides libres.

Les cellules dendritiques pulsées avec le peptide *ras* 55-64^{Q61R} ou le peptide *ras* 55-64^{WT} sont utilisées pour stimuler les lymphocytes CD8+ (3,10⁷ cellules). 3 stimulations sont effectuées à une semaine d'intervalle.

Chaque puits de culture est testé pour la présence de CTLs spécifiques du peptide.

Dans ce but, 7 jours après la dernière stimulation, des 2,10⁶ cellules BM36.1 et exprimant HLA-A*0101 (KELLY *et al.*, Nature, 355, 641, 1992) préalablement incubées à 37°C pendant 12 heures dans du RPMI additionné de 100 µM de peptide N-*ras* 55-64^{WT} ou 55-64^{Q61R}, 1 µM de β2 microglobuline, et lavées dans du PBS, sont ajoutées dans chaque puits.

La réponse CTL spécifique à la stimulation par le peptide N-*ras* de type sauvage ou muté est mesurée par dosage de l'interféron γ (IFN-γ), comme décrit par LABARRIERE *et al.* (Int. J. Cancer, 78, 209, 1998).

Deux des cinq puits de culture stimulés avec le peptide *ras* présentent une prolifération de CTL spécifique du peptide (0,3 et 0,5% de cellules réactives par puits), alors qu'aucune prolifération n'est observée dans les puits stimulés avec le peptide 55-64^{WT}.

EXEMPLE 7 : PROPRIETES D'UN CLONE DE LYMPHOCYTES T INDUIT PAR LE PEPTIDE 55-64^{Q61R}

Des clones lymphocytaires ont été obtenus par dilution limite à partir des cellules du puits de culture contenant 0,5% de cellules T réactives.

La capacité des cellules T issues de l'un de ces clones à lyser des cellules BM36.1 présentant le peptide 55-64^{Q61R} ou le peptide 55-64^{WT} est évaluée selon un dosage standard de libération du ⁵¹Cr (HERIN *et al.*, Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987).

Des cellules BM36.1 marquées avec du ⁵¹Cr (Na²⁵¹CrO₄, ORIS, Gif-sur-Yvette, France). Les cellules sont ensuite pulsées pendant 1 heure à 37°C avec 10 µM de peptide 55-64^{WT} ou de peptide 55-64^{Q61R}, et lavées. 10³ cellules BM36.1 ainsi traitées sont incubées avec 5,10³ cellules T du clone à tester pendant 4 heures. Les surnageants de culture sont récupérés et le pourcentage de ⁵¹Cr libéré est évalué.

On observe une lyse importante des cellules BM36.1 pulsées avec le peptide *ras* muté 55-64^{Q61R}. En revanche, la lyse des cellules BM36.1 pulsées avec le peptide *ras* de type sauvage est très faible.

La spécificité de ce clone vis-à-vis de cellules exprimant HLA-A*0101 et la protéine sauvage ou la protéine N-*ras* portant la mutation Q61R est évaluée sur des cellules COS transfectées, ou sur des cellules de mélanome HLA-A*0101, exprimant ou non la mutation Q61R.

Pour la transfection des cellules COS, un ADNc de 334 pb codant pour un fragment de la protéine N-*ras* de type sauvage est obtenu par amplification PCR, à partir d'ADNc complet de la protéine N-*ras* sauvage. Un ADNc codant pour un fragment de la protéine N-*ras* muté à la position 61 par substitution de la glutamine par une arginine est obtenu par mutagenèse dirigée.

L'ADNc sauvage ou muté est inséré dans le vecteur pcDNA3 et amplifié dans la souche bactérienne *E. coli* TOP 10 F' (INVITROGEN, référence C2020-03).

Un ADNc codant pour la molécule HLA-A*0101 est introduit dans le vecteur pcDNA 3.1 (INVITROGEN, référence CV790-20).

Des cellules COS-7 sont co-transfectées avec ces constructions comme décrit ci-après :

Des cellules COS-7, (BRICHARD *et al.*, J. Exp. Med., 178, 489, 1993) sont cultivées dans le milieu DMEM (BIOWHITTAKER) contenant du sérum de veau fœtal 10%, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (SIGMA, St Louis, USA) et 2 mM de glutamine-L (SIGMA, St Louis, USA).

16,5.10³ cellules COS sont co-transfectées avec 100 ng d'un mélange du vecteur pcDNA 3.1 exprimant HLA-A*0101 et d'un vecteur pcDNA3 exprimant la protéine N-*ras* sauvage ou mutée, par le procédé chloroquine-dextrane-DEAE (BRICHARD *et al.*, J. Exp. Med., 178, 489, 1993 ; SEED *et al.*, PNAS, 84, 3365, 1987.). Les détails de cette méthode sont décrits par DE PLAEN *et al.* (Methods, 12, 125, 1997).

La stimulation des cellules T est mesurée par dosage du TNF (DE PLAEN *et al.*, Methods, 12, 125, 1997 ; LABARRIERE *et al.*, Int. J. Cancer, 78, 209, 1998).

2,10³ à 10⁴ cellules du clone T testé sont ajoutées à 3,10⁴ cellules COS, 48 heures après transfection, ou à 3,10⁴ cellules de mélanome. Les surnageants de culture sont récupérés 6 heures plus tard et leur contenu en TNF est déterminé en mesurant leur effet cytotoxique sur le clone 13 du fibrosarcome murin WEHI 164 (BRICHARD *et al.*, J. Exp. Med., 178, 489, 1993) par dosage colorimétrique MTT. Les résultats obtenus avec les cellules COS transfectées sont présentés dans la Figure 5a : en abscisse, peptides *ras* de type sauvage ou mutés à la position 61 par substitution de la glutamine par une arginine ; en ordonnée, concentration de TNF en pg/ml.

Les résultats montrent que les cellules T du clone sont fortement stimulées par les cellules exprimant la protéine N-*ras* Q61R, alors qu'on n'observe qu'une faible stimulation avec la protéine N-*ras* sauvage.

Les résultats obtenus avec les cellules de mélanome sont présentés dans la Figure 5b : en abscisse, lignées cellulaires de mélanome exprimant la mutation *ras* Q61R (M6, M90, MEL4) ou non (M36, M105, M106, M122, M138, MV1) ; en ordonnée, concentration de TNF en pg/ml

Ces résultats montrent que parmi les lignées de mélanome HLA-A*0101, seules celles exprimant la mutation Q61R (lignées M6, M90 et MEL4) stimulent une réponse des cellules T du clone.

**5 EXEMPLE 8 : IDENTIFICATION D'UN PEPTIDE ANTIGENIQUE PRESENTE
DANS LE CONTEXTE HLA-A*0101.**

Un clone T CD8+, issu d'une population de TIL de mélanome reconnaît un peptide non décrit issu de l'antigène gp100, dans le contexte A*0101 (PLDCVLYRY, SEQ ID NO : 20). L'antigénicité de ce peptide a été testée en évaluant la capacité du clone à lyser des cellules BM36.1 présentant le peptide d'intérêt dans le contexte HLA-A*0101. Les
10 cellules BM36.1 sont marquées pendant 1h à 37°C avec 100 Ci de ⁵¹Cr (Na²⁵¹CrO₄, ORIS, Gif-sur-Yvette, France). Les cellules sont ensuite pulsées pendant 20 minutes avec les différents peptides synthétiques. 10³ cellules BM36.1 ainsi traitées sont incubées avec 10⁴ cellules T du clone (rapport Effecteur :Cible de 10 :1) pendant 4 heures. Les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de ⁵¹Cr libéré est évalué à l'aide d'un compteur de
15 plaque β (EG&G Wallac, Evry, France). Un contrôle négatif est effectué avec un peptide non-pertinent.

Les résultats sont présentés dans la figure 6 : en ordonnée le pourcentage de lyse cellulaire obtenue, en abscisse la concentration en peptide PLDCVLYRY (□), ou VPLDCVLYRY (◆). L'EC₅₀ pour le peptide PLDCVLYRY est de 0,6 μM, alors que l' EC₅₀ pour le
20 peptide PLDCVLYRY est de 10 μM.

La séquence de ce peptide est comprise dans la séquence du décimère reconnu dans le contexte B*3501, mais ce peptide n'est pas reconnu par le clone M28.9B. En revanche, le peptide VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) est également reconnu dans le contexte A*0101 par le clone M199.6.12 (Tableau I et Figure 6).

25 De plus, la reconnaissance spontanée par le clone M199.6.12, de lignées de mélanome partageant le HLA-A*0101 montre que cet épitope est présenté efficacement par ces tumeurs.

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'au moins un peptide immunogène représentant un épitope T présenté par le CMH I, choisi parmi :

- a) un peptide comprenant la séquence $EX_1AGIGILX_2$ (SEQ ID NO : 1) dans laquelle X_1 représente A ou P, et X_2 représente T ou Y, capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène Melan-A ;
 - b) un peptide comprenant la séquence EVDPIGHVY (SEQ ID NO : 2), capable d'induire une réponse T cytotoxique dirigée contre l'antigène MAGE-A6 ;
 - c) un peptide comprenant la séquence VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3), capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène gp100 ;
 - d) un peptide comprenant la séquence TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4), capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène tyrosinase ;
 - e) un peptide comprenant la séquence MPFATPMEA (SEQ ID NO : 5), capable d'induire une réponse cytotoxique dirigée contre l'antigène NY-ESO-1;
- pour l'obtention d'un médicament destiné à l'immunothérapie anti-tumorale chez un patient HLA-B35.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit peptide est choisi parmi :

- a) un peptide de séquence choisie parmi : TAEEAAGIGILTV (SEQ ID NO : 6), EAAGIGILTVIL (SEQ ID NO : 7), EAAGIGILTV (SEQ ID NO : 8), EAAGIGILTY (SEQ ID NO : 9), EAAGIGILY (SEQ ID NO : 10), EPAGIGILTY (SEQ ID NO : 11), EPAGIGILTV (SEQ ID NO : 12) ;
- b) un peptide de séquence EVDPIGHVY (SEQ ID NO : 2) ;
- c) un peptide de séquence choisie parmi VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3) et VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) ;
- d) un peptide de séquence choisie parmi TPRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 15) et TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4) ;
- e) un peptide de séquence choisie parmi : LAMPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 16), LAMPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 17), MPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 18), MPFATPMEAEL (SEQ ID NO : 19) et MPFATPMEA (SEQ ID NO : 5).

3) Peptide immunogène représentant un épitope T présenté par le CMH I, choisi parmi :

- un peptide de séquence choisie parmi : EAAGIGILTY (SEQ ID NO : 9), EAAGIGILY (SEQ ID NO : 10), EPAGIGILTY (SEQ ID NO : 11), EPAGIGILTV (SEQ ID NO : 12) ;
- un peptide de séquence choisie parmi : VPLDCVLYR (SEQ ID NO : 3), VPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 13) et PVPLDCVLYRY (SEQ ID NO : 14) ;
- un peptide de séquence choisie parmi : TPRLPSSADVEFCL (SEQ ID NO : 15) et TPRLPSSADVEF (SEQ ID NO : 4).

- 4) Composition multi-épitopique comprenant au moins deux peptides de deux catégories différentes parmi les catégories a) b) c) d) ou e) telles que définies dans la revendication 1 ou 2.
- 5) Composition multiépitopique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide de chacune de ces catégories a) b) c) d) ou e) telles que définies dans la revendication 1 ou 2.
- 6) Composition multi-épitopique selon une quelconque des revendications 4 ou 5, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies de chacun desdits peptides.
- 10 7) Polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique selon la revendication 6.
- 8) Cellule présentatrice de l'antigène exprimant un allèle HLA-B35 du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est chargée par un peptide tel que défini dans une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 9) Cellule présentatrice de l'antigène exprimant un allèle HLA-B35 du CMH I, caractérisée en ce qu'elle est transfectée par un polynucléotide selon la revendication 7.
- 15 10) Utilisation d'au moins un peptide tel que défini dans une quelconque des revendications 1 à 3, pour la détection *in vitro* de CTLs dirigés contre un ou plusieurs des antigènes Melan-A, MAGE-A6, gp100, tyrosinase, et NY-ESO-1, dans un prélèvement biologique obtenu à partir d'un sujet HLA-B35.

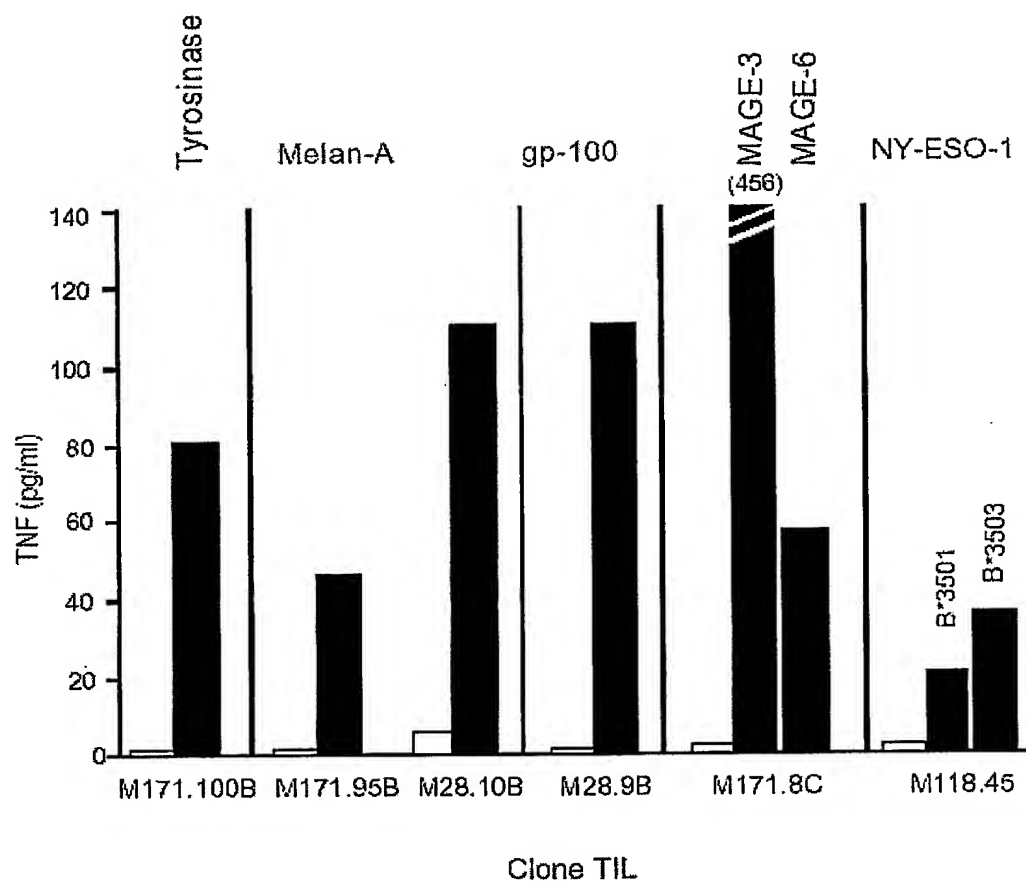


FIG. 1

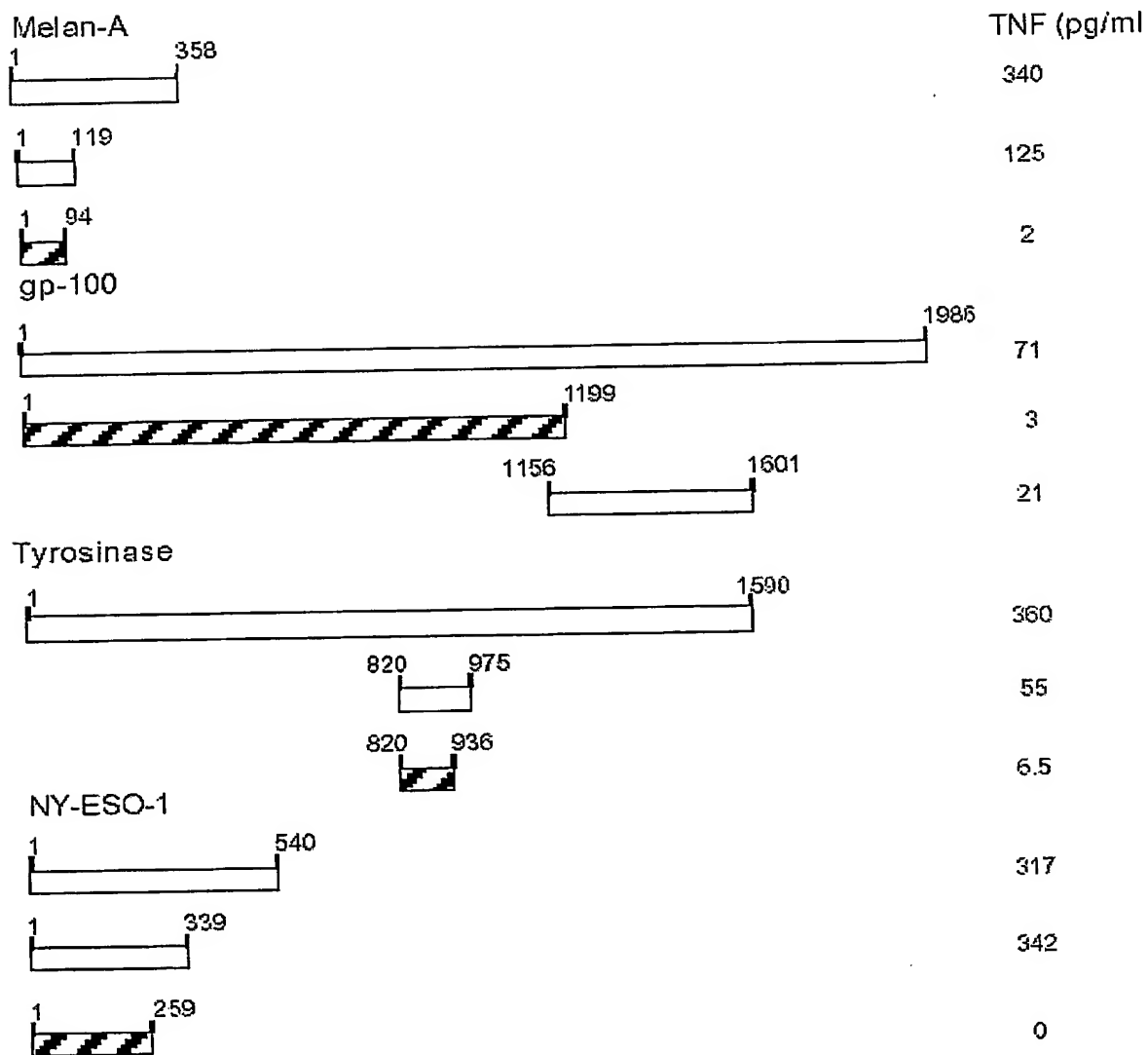


FIG. 2

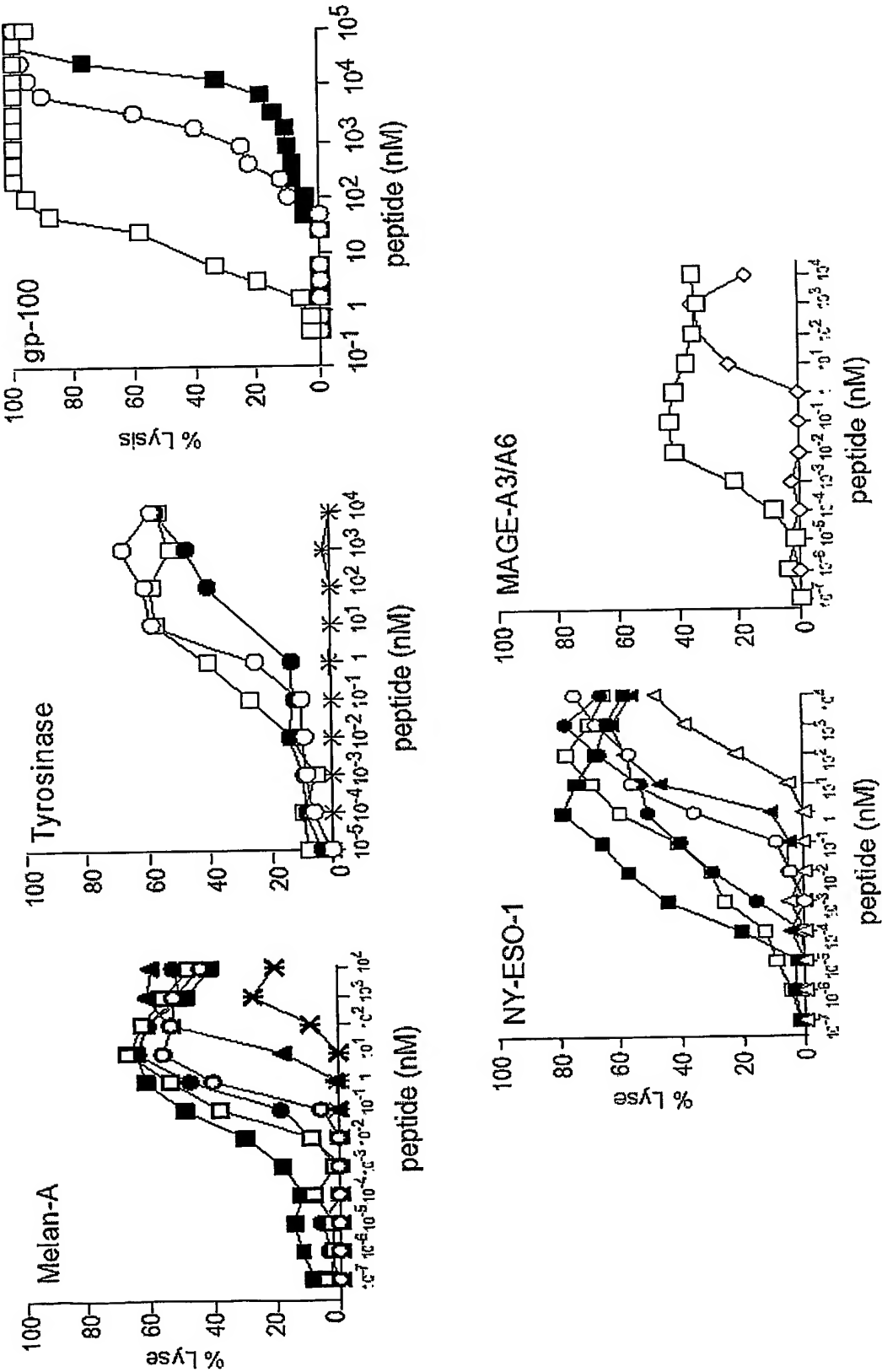


FIG. 3

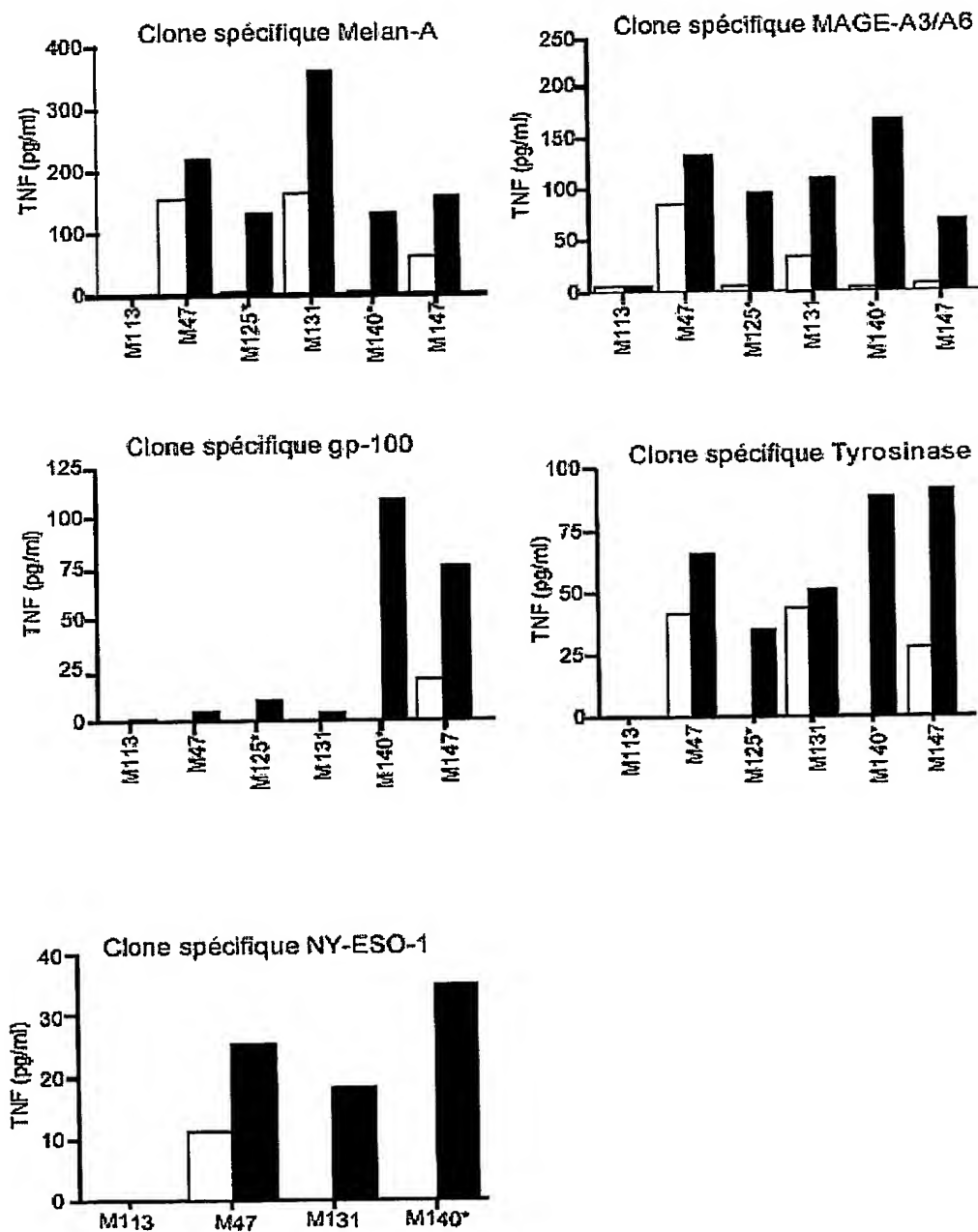


FIG. 4

5/6

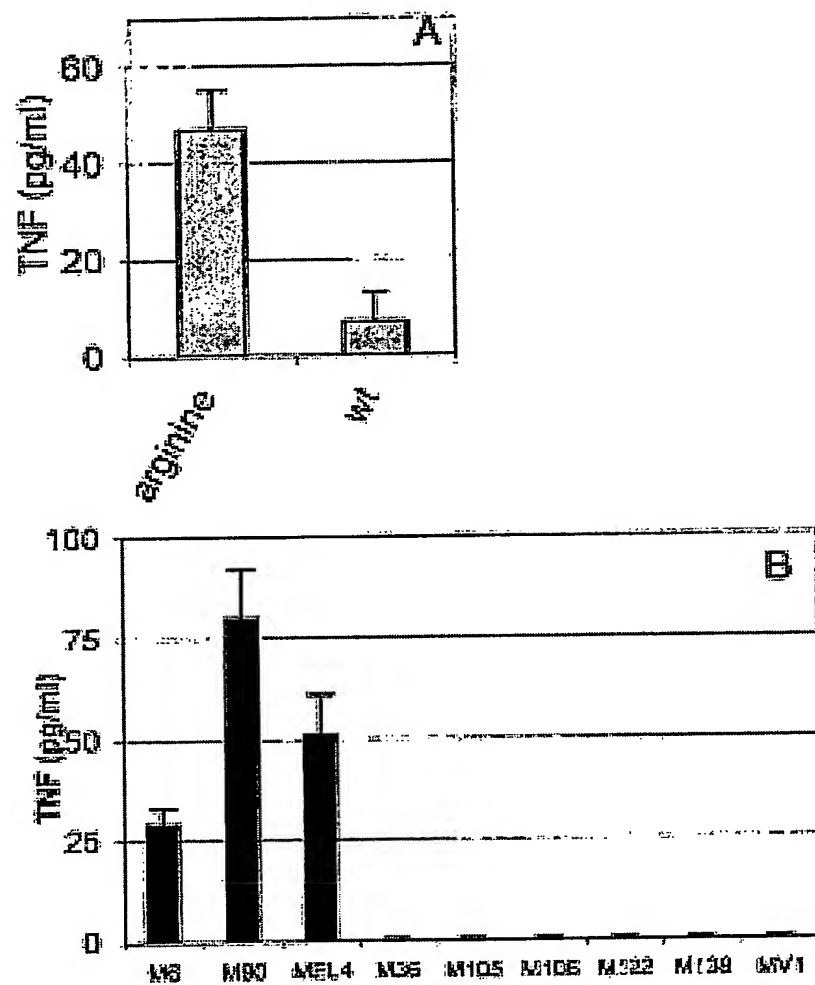


FIG. 5

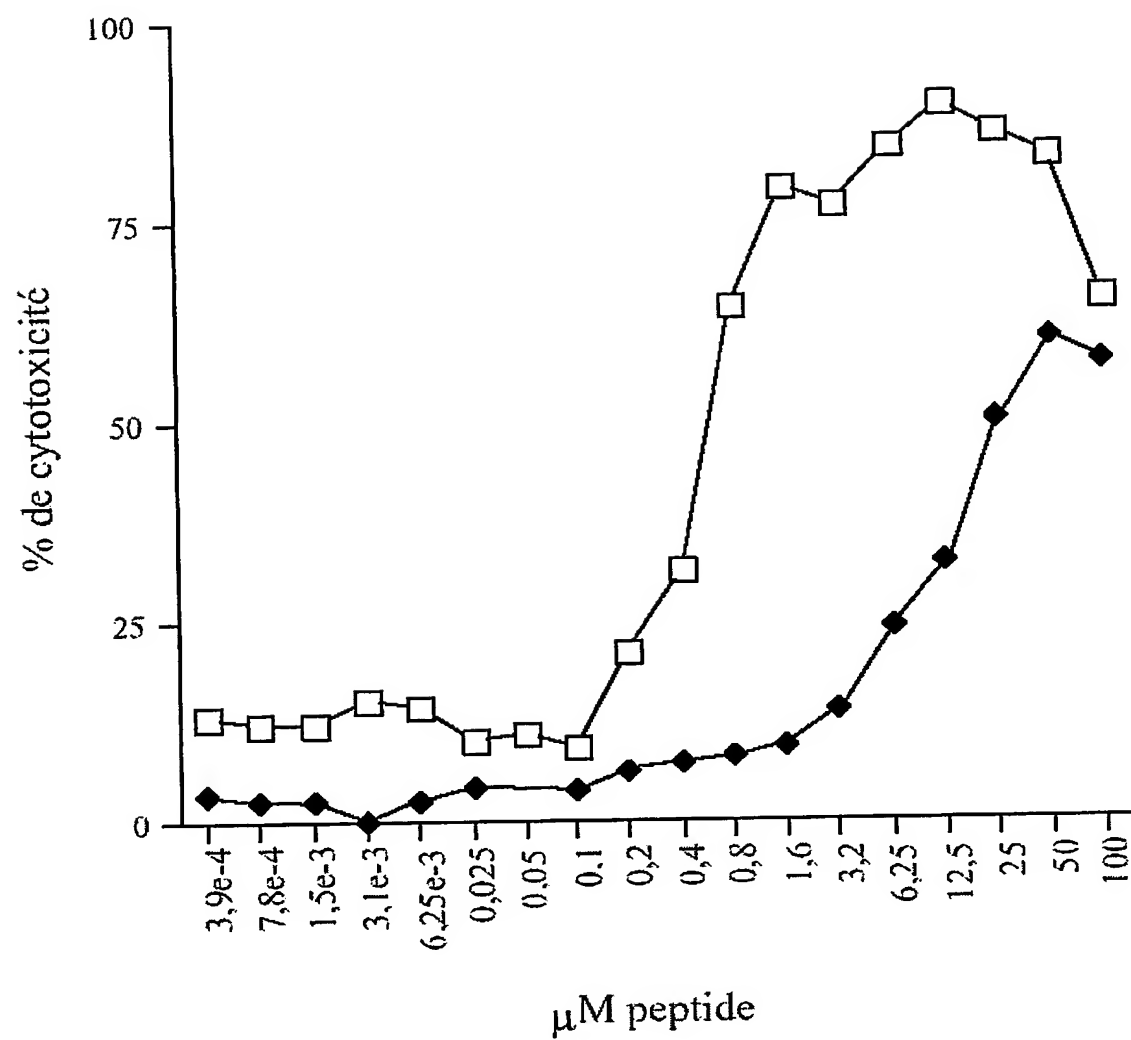


FIG. 6

SEQUENCE LISTING

<110> INSERM
UNIVERSITE DE NANTES
LINARD, Boris
JOTEREAU, Francine
BENLALAM, Houssein
DIEZ, Elizabeth
GUILLOUX, Yannick
LABARRIERE, Nathalie
GERVOIS, Nadine
DERRE, Laurent

<120> PEPTIDES UTILISABLES EN IMMUNOTHERAPIE ANTITUMORALE

<130> MJPbv598/64

<160> 35

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa= A ou P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa= T ou Y

<400> 1

Glu Xaa Ala Gly Ile Gly Ile Leu Xaa
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Val Tyr
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe
1 5 10

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala
1 5

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Ile Leu
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 9

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 10

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Tyr
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 11

Glu Pro Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 12

Glu Pro Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Val	Pro	Leu	Asp	Cys	Val	Leu	Tyr	Arg	Tyr
1				5					10

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr	Pro	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	Asp	Val	Glu	Phe	Cys	Leu
1				5									10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu
1				5					10			

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Leu	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu
1				5					10		

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu
1				5					10	

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu
1				5					10

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
1 5

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu
1 5 10

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr
1 5

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe Cys
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu
1 5 10

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe Cys Leu
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val
1 5 10

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe Cys
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> peptide modifié

<400> 33

Glu Pro Ala Gly Ile Gly Ile Leu Tyr
1 5

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Arg	Glu	Glu	Tyr
1				5					10